

生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立（第3報）

渡辺晃行・戸塚 豊^{*1}・根本聰実・韋澤圭二郎

要 約

生体吸引卵子による初期胚作出技術を確立するために、体外受精後の発生培養培地について、と畜場由来の卵巣から吸引した卵子を用いて、TCM199, CR1aa, IVD101およびIVMDの培地を比較検討した。胚盤胞までの発生率では、IVD101, CR1aa, TCM199およびIVMDはそれぞれ38.7%, 29.9%, 27.1%, 6.3%でIVD101が最もよく、培地調整などの操作面でもIVD101は簡便であり、操作による汚染が少ない。したがって発生培養培地としてはIVD101が最も適していると考えられた。生体卵子吸引は、21頭実施し、84個（1頭平均4.0個）の卵子を吸引した。そのうち正常卵子は73個（正常卵率87.0%）であった。吸引した正常卵のうち10個をIVFに使用したところ、4個（40.0%）が胚盤胞まで発生し、これらの胚を3頭に移植した結果1頭が受胎した。

キーワード：体外受精、生体吸引卵子、IVD101

緒 言

ウシの胚移植技術は乳用牛や肉用牛の育種改良に利用されており、農家段階にも普及してきているが、さらに普及定着化するためには、移植に使う胚の効率的な生産技術の確立と低コスト化が求められている。その1つの方法として体外受精による胚生産技術が開発された。しかしながらこの方法ではと畜場の雌牛卵巣を使用しているため、母牛の血統が特定できず生産された子牛の登録が出来ないという問題があった。

そのため生体の卵巣から直接卵子を吸引し、体外受精によって胚を生産する技術（生体吸引卵子、OPU）が考案された。この方法で吸引した卵子は卵子提供牛（母牛）が特定できるので、体外受精によって血統登録が可能な胚を生産できる。

またこの方法が確立できればホルモン処理の必要がなく、しかも同一牛からの卵子の連続採取も可能であることから、胚生産の効率化、低コスト化が図られる。

そこで本試験では生体吸引卵子による初期胚作出技術を確立し、胚移植技術の向上と普及定着化を図る。

今年度はと畜場由来の卵巣から吸引した卵子を用いて、体外受精後の発生培養培地について検討するとともに生体卵子吸引の技術を確立する。

材料及び方法

1. 材料

卵巣はと畜場より採取した品種不明の雌牛113頭から採取された226個の卵巣を使用した。体外受精には黒毛和種の凍結精液を使用した。

2. 方法

1) 卵子の吸引

卵子は、卵巣の表面に存在する直径5mm以下の卵胞から吸引した。吸引には長さ38mm直徑1.2mmの注射針を使用し、吸引器（280mmHg）または注射器を用いて、卵子回収液OCM（機能性ペプチド研究所）を入れた容器に回収した。

2) 卵子の培養

卵子回収液OCM中に回収した卵子を、牛胎児血清（FCS, SEBAK）を10%添加したTCM199（GIBCO）に2回洗浄後投入し、38.5°C, 5% CO₂, 95%空気の気相条件で20–22時間成熟培養した。

3) 体外受精

媒精液にIVF100（機能性ペプチド研究所）を使用し、黒毛和種精液で6時間培養した。

4) 受精胚の発生培養

体外受精処理後、卵子を4種類の発生培養液に移して、38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 95%空気の気相条件下で培養した。

*1現 茨城県県北家畜保健衛生所

使用した発生培養液は、10%牛胎児血清を添加したTCM199, CR1aa²⁾, IVD101, IVMD（機能性ペプチド研究所）である。

受精の確認は、培養開始後の発生の有無で行った。さらに培養開始後192時間までに、胚盤胞に発育した胚を正常発育胚とした。

5) 生体卵子吸引

吸引には超音波診断装置（アロカ SSD-900SE）に吸引針ガイドを装着した同機専用の経腔プローブ（7.5MHz）を接続したものおよび吸引針（ミサワ医科工業製 ディスポートザブル採卵針）に吸引ポンプ（富士平工業製）を接続したもの用いた。吸引圧は90～120mmHgに設定した。

供試牛は保定後、尾椎硬膜外麻酔を行い尾部および外陰部を洗浄消毒した。

腔内に採卵針ガイドを装着したプローブを装入し、直腸内に装入した手で卵巣をプローブの先端付近に誘導し、超音波診断装置の画面に卵巣を映し出した。

直径2mm以上の卵胞数を確認し、採卵針を採卵ガイドに装入し画像上で確認できるすべての卵胞を吸引するように努めた。かん流液は10IU/mlのノボヘパリンを添加した1%非働化牛胎児血清加修正ダルベッコPBS (D-PBS)を使用した。

チューブ内の血液の凝固を防止するため約3分ごとにかん流液で吸引針およびチューブ内の洗浄を行なった。

卵子吸引液をEmconフィルターに通した後、卵子を検索し、Aランク胚を体外受精に用いた。

結果および考察

と畜場由来卵巣からの卵子の採取状況を表1に示した。

166個の卵巣から1,405個（1卵巣あたり8.5個）の卵子が採取できた。このうちAランク胚は1,202個（1卵巣あたり7.2個）で、回収した卵子の85.6%であった。

表1 吸引卵子数

卵巣数 (頭数)	吸引 卵子数	1卵巣 あたり	Aランク 卵子数	1卵巣 あたり
個(頭)	個	個	個	個
166 (83)	1405	8.5	1202	7.2

このAランク胚を用いて、体外受精後の発生培養に用いる培養液の検討を行った。培養液別の胚の発生成績を表2に示した。

胚盤胞までの発生率は、IVD101が他の培養液に比べて若干高く、CR1aaとは有意差は認められなかったが、TCM-199, IVMDとは5%水準で有意差が認められた。

表2 発生培養液別の胚の発生成績

培養液	Aランク 卵子数	受精数(率)	胚盤胞数(率)
	個	個(%)	個(%)
TCM199	541	266(49.2) ^b	72(27.1) ^b
CR1aa	265	134(50.6) ^b	40(29.9) ^{ab}
IVD101	163	106(65.0) ^a	41(38.7) ^a
IVMD	233	143(61.4) ^a	9(6.3) ^c

a,b : 同一列内異符号間に5%水準で有意差あり

また、培地の調整など操作の面では、IVD101が簡便であり、操作による汚染が少ないため、発生率の成績を考慮すると発生培養用の培地としてはIVD101の方が適していると考えられた。以上のことから、本センターでは体外受精卵の培養液として、無血清培地のIVD101を用いることとした。

生体卵子吸引の結果を表3に示した。延べ21頭実施し、84個の卵子を吸引した。1頭あたり平均4.0個だった。このうち正常卵子は73個で正常卵率は87.0%だった。

表3 生体卵巣から吸引した卵子数

頭数	吸引 卵子数	1頭 あたり	Aランク 卵子数	1頭 あたり
頭	個	個	個	個
21	84	4.0	73	3.5

正常卵子のうち10個を体外受精に供したところ、4個が胚盤胞まで発生した（発生率40.0%）。このうち3個を3頭に1胚移植した結果、1頭が受胎した。（表4）

表4 生体卵子吸引由来胚の受胎率

供試 卵数 個 10	胚盤胞数 (率) 個 (%) 4(40.0)	移植 頭数 頭 3	受胎数 (率) 頭(%) 1(33.3)
---------------------	---------------------------------	--------------------	-------------------------------

今後はさらに黒毛和種の供卵牛（生体）の卵巢から卵子を吸引採取する頭数を増やし、より効率的な卵子吸引技術の確立と体外受精後効率的に胚盤胞まで発生させるための、供卵牛の選定と採卵時の卵子吸引条件について検討する。

謝 辞

本試験をおこなうにあたり、卵巣材料提供に御協力いただいた茨城県中央食肉公社ならびに茨城県県北食肉衛生検査所職員諸氏に深謝します。

参考文献

- 菅原 徹・太田土美・宇田三男. 生体吸引卵子による初期胚作出技術の確立（第1報）. 茨城県畜産試験場研究報告, 30. 53-54. 2000.
- 社団法人畜産技術協会 牛の受精卵移植技術マニュアル, 1995